

平成 23 年 5 月 9 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590127

研究課題名 (和文)

主要カンナビノイドの代謝的相互作用を介した毒性発現の分子機構

研究課題名 (英文)

Molecular mechanism for interaction of major cannabinoids with enzyme system

研究代表者

渡辺 和人 (WATANABE KAZUHITO)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：30113038

研究成果の概要 (和文)：大麻の毒性発現機構解明の一環として、主成分テトラヒドロカンナビノール (THC)、カンナビジオール (CBD) およびカンナビノール (CBN) の代謝、代謝的相互作用、細胞毒性に関して検討を行い、以下の点を明らかにした。(1) THC のマウス脳における代謝。(2) CBD のヒト肝における代謝。(3) THC、CBD、CBN のヒト CYP 分子種の阻害作用および誘導作用。(4) THC のカンナビノイド受容体を介した細胞毒性およびヒト乳癌細胞増殖促進作用の機構。(5) シクロオキシゲナーゼ-2 選択的阻害剤としてのカンナビジオール酸、選択的 5-リポキシゲナーゼ (LOX) 阻害剤としての CBD-ジメチルエーテル、THC および主代謝物 THC-11-oic acid の強力な 15-LOX 阻害作用。

研究成果の概要 (英文)：Metabolic interaction and cell toxicity of major constituents of marijuana were studied and the following points were clarified. (1) Major CYP enzymes involved in the metabolism THC with mouse brain microsomes. (2) Major CYP enzymes involved in the metabolism of cannabidiol with human liver microsomes. (3) Inhibitory and inductive effects of major cannabinoids on human liver CYP enzymes. (4) Mechanisms of THC to induce cell toxicity (J774-1 cells) and stimulation of cell proliferation (MCF-7 cells). (5) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by cannabidiolic acid; selective inhibition of 5-lipoxygenase by CBD-dimethylether; Potent inhibition of 15-lipoxygenase by tetrahydrocannabinol and its major urinary metabolite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：衛生化学、裁判化学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：カンナビノイド、シトクロム P450、COX、LOX、酵素阻害、酵素誘導、細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

法規制下にある大麻成分 (カンナビノイド) の毒性発現およびその機構解明は重要な研究課題である。我々は、これまで一貫してカンナビノイドの代謝と毒性発現との関連性につ

いて研究してきた。主要カンナビノイドは、高い脂溶性を有し生体膜により高濃度に分布し、膜酵素である CYP により代謝を受けることが明らかになっている (I. Yamamoto, K. Watanabe et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27,

741 (1995))。この過程において、多くの薬毒物と代謝的相互作用が予測されるがその詳細は不明であり、特にヒト CYP に関する報告はほとんどない。我々はヒト肝ミクロソームおよびヒト CYP 発現系による検討から、主要カンナビノイド(THC、CBD および CBN)が CYP1A、CYP2C および CYP3A 分子種の酵素活性を分子種特異的に阻害することを見いだしている。従って、これら阻害の分子機構を含めた代謝的相互作用を検討することは大麻の毒性を考える上でも重要である。この他、薬毒物にとどまらず、生体内物質との代謝的相互作用を検討することも重要である。カンナビノイドの構造はステロイドに類似していることから、ステロイドホルモン生合成系および分解系に関わる酵素に影響することが考えられており、我々もこれに関しては、一部報告をすでに行っている(K. Watanabe et al., *Toxicology*, 206, 471 (2005), T. Funahashi, K. Watanabe et al., *J. Health Sci.*, 51, 369 (2005))。近年、内因性カンナビノイド (アナンダミド、2-アラキドノイルグリセロール) が見出され、これらは生体内でリポドメディアータとして機能していることが示唆されている。従って、カンナビノイドはこれら内因性カンナビノイドの間にも代謝的相互作用を起こすことが考えられるが、この点についても全く未解明である。内因性カンナビノイド以外にも、リポドメディアータとして知られるプロスタグランジンやロイコトリエンとの代謝的相互作用も考えられる。プロスタグランジン生合成に及ぼすカンナビノイドの影響に関しては、Burstein ら(*Pharmacol. Ther.*, 82, 87 (1999))が THC の代謝物である THC-11-oic acid のシクロオキシゲナーゼ阻害作用について報告している。

また、これらと関連して、カンナビノイドの内分泌系の影響や細胞毒性およびその発現機構を明らかにすることは、大麻の毒性を考える上でも重要である。

## 2. 研究の目的

(1) カンナビノイドのヒトにおける代謝および代謝に関与する酵素分子種を明らかにする。(2) カンナビノイドの細胞毒性およびその機構を解明する。(3) カンナビノイドと薬毒物との第 I 相酵素を介した代謝的相互作用の全体像を明らかにする。(4) 内因性物質の代謝酵素を介した代謝的相互作用の全体像を明らかにする。(5) 代謝的相互作用の分子機構の解析と毒性発現の可能性について明らかにする。

これまで、カンナビノイドの代謝に関しては多くの知見が報告されている。しかし、1) THC 以外のカンナビノイドの知見、2) 内因性物質との関連性および 3) ヒトにおける知見は少なく、未解明の点が多い。我々は、主要カンナビノイドのうち THC および CBN は、ヒトにおいては主に CYP2C9 および CYP3A4 により代

謝されることを明らかにしており、これら分子種により代謝を受ける薬毒物との間に相互作用が予測される。THC の代謝に関連した情報は、各種動物を用いた研究は多く報告されているがヒトに関する知見は少なく、CBD および CBN に関してはほとんどない。従って、薬毒物との代謝的相互作用をヒト酵素について検討することは、カンナビノイドの毒性発現や生物活性を考える上で意義深い。また、内因性物質との代謝的相互作用に関してはヒト組織を用いて検討することは困難であると思われるが、同じ霊長類であるサルにおけるデータが得られればヒトでの作用を推測できるものと思われる重要である。また、カンナビノイドの毒性発現機構を細胞下で検討することは、大麻成分の毒性発現を考える上で意義深い。

## 3. 研究の方法

(1) マウス脳ミクロソームによる主要カンナビノイドの代謝反応を行い、GC-MS により解析し、生成する代謝物および代謝に関与する CYP 分子種を解析した。

(2) ヒト CYP 発現系による CBD の代謝反応：これまで THC および CBN については当研究室でも報告しているが(K. Watanabe et al., *Foren. Toxicol.*, 24, 80 (2006); K. Watanabe et al., *Life Sci.*, 80, 1415 (2007))、CBD については全く報告がない。従って、ヒト肝ミクロソームおよびヒト CYP 発現系を用いた代謝反応を行い、代謝物を GC-MS により分析し、解析した。

(3) ヒト CYP 発現系 (CYP1A、CYP2A、CYP2C、CYP2D、CYP2E および CYP3A)を酵素源として THC、CBD および CBN の酵素阻害作用について解析した。また、阻害作用については、発現系と共にヒト肝ミクロソームを用い、CYP 分子種の特異的阻害剤 (CYP1A:  $\alpha$ -ナフトフラボン、CYP2A: メトキシソラーレン、CYP2C: スルファフェナゾール、CYP2D: キニジン、CYP2E: ジエチルジチオカルバメート、CYP3A: ケトコナゾール)の影響について比較検討した。

(4) カンナビノイド (特に THC) の細胞毒性発現および増殖に及ぼす影響について、主にマウス J774-1 細胞およびヒト乳癌細胞 (MCF-7)を用いて検討し、作用機構をカンナビノイド受容体との関連を含めて解析した。

(5) エイコサノイドの代謝に関しては、サル精巢のシクロオキシゲナーゼ (COX-1 および COX-2)に対する主要カンナビノイド (THC、CBD および CBN)の影響を検討、解析した。また、併せて 5-、12-および 15-リポキシゲナーゼ (LOX) についても検討、解析した。

(6) 内因性カンナビノイドとの相互作用については、ヒト肝アナンダミド水解酵素およ

び 2-アラキドノイルグリセロール水解酵素に対する主要カンナビノイド (THC、CBD および CBN) の影響を検討、解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) THC の脳ミクロソームによる代謝

THC はマウス脳ミクロソームにより、主に 4'-および 5'-位で水酸化を受けることが明らかとなった。これは、これまでの肝における結果と大きく異なる結果であった。これら代謝活性は、CYP3A 阻害剤であるケトコナゾールおよびトリアセチルオレアンドマイシンで強く阻害されたが、CYP1A、CYP2C および CYP2D の阻害剤では何ら影響を受けなかった。従って、マウス脳ミクロソームにおいては、主に CYP3A が THC の代謝に関与することが明らかとなった。これら代謝物は THC 様作用を有することを我々はすでに明らかにしており、THC の作用点の中樞であることから脳における THC の代謝は作用を考える上で重要である。今後、ヒト脳ミクロソームによるカンナビノイドの代謝に関して研究を進展させる予定である。

##### (2) CBD のヒト肝 CYP による代謝

CBD はヒト肝ミクロソームにより 5 種のペンチル側鎖の水酸化体、6 $\alpha$ -、6 $\beta$ -、7-hydroxy 体へと代謝された。この中で主要な代謝物は後者の 3 種であった。CYP 発現系、CYP 分子種選択的酵素活性との相関性、阻害剤などの検討結果から、1 $\beta$ -OH-CBD の生成には CYP1A1、6-OH-CBD の生成には CYP3A、7-OH-CBD の生成には CYP2C19 がそれぞれ主に関与することが明らかとなった。

(3) カンナビノイドによる CYP の阻害および誘導  
主要カンナビノイドはヒト CYP 阻害作用を示し、THC および CBN に加えて、特に CBD が CYP1A1/2、CYP1B1、CYP2B6、CYP2D6 および CYP3A4/5 を強く阻害することを明らかにした。これら阻害には、代謝依存的な機構も一部含まれることが明らかとなった。また、CBD の強い CYP 阻害作用には、CBD の構造中のレゾルシンを基本骨格とするオリベトールの部分が重要であることが明らかとなった。また、主要カンナビノイドの CYP 誘導作用について、肺癌由来の A549 細胞および肝癌由来の HepG2 細胞を用いて検討した結果、CBN が CYP1A1 および CYP1B1 mRNA の発現量を 3.5 倍および 12 倍誘導した。一方、THC および CBN は CYP2B6、CYP3A4 および CYP3A5 の mRNA 発現量には顕著な影響を与えなかった。また、HepG2 細胞においては、THC は CYP1A1 および CYP1A2 mRNA 発現量を約 3 倍、同濃度の CBN は 25~50 倍誘導した。これらの結果は、カンナビノイドの作用発現を考える時の重要な知見であるとともに、大麻吸煙による発がん性物質の代謝的活性化や医薬品との相互作用を理解する上での貴重な基礎データである。

##### (4) カンナビノイドの細胞毒性

THC のマウス J774-1 細胞に対する毒性発現は、

カンナビノイド CB2 受容体および Gi/o タンパク質を介したカスパーゼ 1 に依存したシグナル伝達系が関与する事を明らかにした。また、その分子機構の 1 つとして p38MAPK のリン酸化が関係する事が示された。その他、我々は先に THC がヒト乳がん細胞 (MCF-7) の増殖促進作用を有する事を報告しているが (Watanabe et al., *Toxicology*, 206, 471 (2005))、この分子機構解明について検討を行い、THC はカンナビノイド受容体を介さない新規な機構により MCF-7 細胞増殖を促進する知見を得た。この機構の少なくとも一部にヒト上皮増殖因子受容体 2 型が関与することが示された。さらに、THC の作用は aromatase および COX-2 を介して制御されていることを示した。これらの結果は、カンナビノイドの内分泌系への影響を考える上で重要な知見である。

##### (5) カンナビノイド関連化合物による COX-2 および LOX の阻害

大麻主成分の 1 つである CBD は、THC のような幻覚作用を示さないが抗痙攣作用や抗不安作用を有し、医療への応用も試みられてきた。しかし、CBD は (2) でも示したように強い CYP 阻害作用を有する。そこで CYP 阻害作用の比較的弱い CBD 誘導体および関連化合物について COX-2 および LOX 阻害物質を検索した。その結果、カンナビジオール酸 (CBDA) が強力な COX-2 選択的阻害剤であることを見出した。また、CBD dimethylether は高い選択性を有する 5-LOX 阻害剤であることが明らかになった。CBD 誘導体の酵素阻害は毒性面のみならず、医療への応用面でも貴重な基礎データとなるものである。さらに、 $\Delta^9$ -THC は 15-LOX の強力な阻害剤 ( $IC_{50} = 2.42 \mu M$ ) であることを明らかにした。また、主代謝物である  $\Delta^9$ -THC-11-oic acid にも阻害作用が認められた。この他、11-hydroxy- $\Delta^9$ -THC および 11-hydroxy- $\Delta^8$ -THC は、12-LOX を選択的に阻害することを明らかにした。これらの結果は、THC および代謝物がこれら LOX の阻害作用により、脂質関連疾患の予防因子として働くことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Satoshi Yamaori, Juri Ebisawa, Yoshimi Okushima, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety, *Life Sci.*, 88, 730-736 (2011). (査読有)

- 2) Shuso Takeda, Rongrong Jiang, Hironori Aramaki, Masumi Imoto, Akihisa Toda, Reiko Eyanagi, Toshiaki Amamoto, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe,  $\Delta$  9-Tetrahydrocannabinol and its major metabolite  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid as 15-lipoxygenase inhibitors, *J. Pharm. Sci.*, 100, 1206-1211 (2011). (査読有)
- 3) Kazuhito Watanabe, Mai Fujinami, Satoshi Yamaori, Ikuo Yamamoto, Possible involvement of Cyp3a enzymes in the metabolism of tetrahydrocannabinols by mouse brain microsomes, *Foren. Toxicol.*, 29, 56-60 (2011) (査読有)
- 4) Satoshi Yamaori, Mika Kushihara, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabianol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, 79, 1691-1698 (2010). (査読有)
- 5) Shuso Takeda, Noriyuki Usami, Ikuo Yamamoto, and Kazuhito Watanabe, Cannabidiol-2',6'-dimethyl ether, a cannabidiol derivative, is a highly potent and selective 15-lipoxygenase inhibitor. *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1733-1737 (2009).
- 6) Shuso Takeda, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe, Modulation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced MCF-7 breast cancer cell growth by cyclooxygenase and aromatase. *Toxicology*, 259, 25-32 (2009). (査読有)
- 7) Shuso Takeda, Satoshi Yamaori, Erina Motoya, Tamihide Matsunaga, Toshiyuki Kimura, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol enhances MCF-7 cell proliferation via cannabinoid receptor-independent signaling, *Toxicology*, 245, 141-146 (2008). (査読有)
- 8) Noriyuki Usami, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Generation of reactive oxygen species during mouse hepatic microsomal metabolism of cannabidiol and cannabidiol hydroxyquinone, *Life Sci.*, 83, 717-724 (2008). (査読有)
- 9) Shuso Takeda, Koichiro Misawa, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis, *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1917-1921 (2008). (査読有)
- 害作用、日本薬学会第 131 年会、静岡市、ツインメッセ静岡 (2011.3.30).
- 2) 蔣 融融、大麻主成分カンナビジオールによるマウス肝シトクロム P450 の発現誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡市、ツインメッセ静岡 (2011.3.30).
- 3) 前田 千佳子、大麻吸煙成分のニコチン代謝酵素 CYP2A6 および CYP2B6 に対する影響、日本薬学会北陸支部第 122 回例会、金沢市、北陸大学 (2010.11.21).
- 4) 奥島 祥美、大麻非幻覚成分カンナビジオールによるヒト CYP1A1 活性阻害の機構解析、日本薬学会北陸支部第 122 回例会、金沢市、北陸大学 (2010.11.21).
- 5) 岡本 泰佳、大麻主成分カンナビジオールによる CYP2D6 の阻害と機構解析、日本薬学会北陸支部第 122 回例会、金沢市、北陸大学 (2010.11.21).
- 6) 山折 大、大麻非幻覚成分カンナビジオールによるヒト CYP3A の可逆的阻害、日本薬物動態学会第 25 回年会、大宮市、大宮ソニックシティ (2010.10.7).
- 7) 奥島 祥美、CYP1A1 のカンナビジオールによる阻害効果に構造上必要なもの、日本薬物動態学会第 25 回年会、大宮市、大宮ソニックシティ (2010.10.7).
- 8) 前田 千佳子、CYP2A6 および CYP2B6 における主要カンナビノイドの阻害効果、日本薬物動態学会第 25 回年会、大宮市、大宮ソニックシティ (2010.10.7).
- 9) 岡本 泰佳、大麻主成分カンナビジオールによる CYP2D6 阻害におけるレゾルシン構造とペンチル側鎖の役割、日本法中毒学会第 29 年会、東京都、日本医科大学 (2010.7.24).
- 10) 蔣 融融、カンナビジオールのヒト肝ミクロソームによる主代謝物生成に関与するシトクロム P450 分子種、日本薬学会第 130 年会、岡山市、桃太郎アリーナ (2010.3.30).
- 11) 竹田 修三、15-リポキシゲナーゼ阻害作用を示す大麻主成分 delta-9-THC とその代謝物、日本薬学会第 130 年会、岡山市、桃太郎アリーナ (2010.3.30).
- 12) 蔣 融融、大麻主成分カンナビジオールのヒト肝ミクロソームによる代謝反応に関与するシトクロム P450 分子種、フォーラム 2009、衛生薬学・環境トキシコロジー、宜野湾市、沖縄コンベンションセンター (2009.11.5).
- 13) 衣笠 裕香、大麻非幻覚成分カンナビジオールによるヒト CYP1A 発現誘導、フォーラム 2009、衛生薬学・環境トキシコロジー、宜野湾市、沖縄コンベンションセンター (2009.11.5).
- 14) 岡本 泰佳、大麻非幻覚成分カンナビジオールの CYP2D6 阻害機構、フォーラ

[学会発表] (32 件)

- 1) 山折 大、大麻主成分カンナビノイドのヒト肝薬物代謝酵素シトクロム P450 に対する阻

- ム 2009、衛生薬学・環境トキシコロジー、  
宜野湾市、沖縄コンベンションセンター  
(2009.11.5).
- 15) 前田 千佳子、大麻主成分による CYP2A6  
の阻害作用、フォーラム 2009、衛生薬学・  
環境トキシコロジー、宜野湾市、沖縄コン  
ベンションセンター (2009.11.5).
- 16) 藤波 舞、脳ミクロソーム CYP によるテト  
ラヒドロカンナビノールヒトの代謝、日本  
法中毒学会第 28 年会、金沢市、北陸大学ア  
ネックスファーム (2009.6.13).
- 17) 中原 亨、11-ヒドロキシ- $\Delta^8$ -テトラヒドロ  
カンナビノールの CYP2C9 による代謝反応  
における重水素同位体効果および立体選択  
性、日本薬学会第 129 年会、京都市、京都  
国際会議場 (2009.3.27) .
- 18) 竹田 修三、カンナビジオール誘導体、カン  
ナビジオール-2',6'-ジメチルエーテル：選  
択的かつ強力な 15-リポキシゲナーゼ阻害剤、  
日本薬学会第 129 年会、京都市、京都国際  
会議場 (2009.3.27) .
- 19) 竹田 修三、 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノ  
ールによる MCF-7 細胞増殖の細胞内エストロ  
ジェン産生系による調節、フォーラム 2008、  
衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本  
(2008.10.17) .
- 20) Satoshi Yamaori, Selectivity of major  
cannabinoids toward inhibition of human  
CYP3A isoforms, MDO2008, サラトガスプリ  
ングス U.S.A. (2008.7).
- 21) 山折 大、 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノ  
ール、カンナビジオールおよびカンナビノ  
ールによるヒト CYP1 酵素の代謝依存的阻害  
の解析、日本法中毒学会第 27 年会、東京都、  
昭和大学上条講堂 (2008.6.13) .
- 22) 竹田 修三、カンナビジオール酸、大麻草  
中の選択的シクロオキシゲナーゼ-2 活性阻  
害成分、日本法中毒学会第 27 年会、東京都、  
昭和大学上条講堂 (2008.6.13) .
- 23) 増田 和文、分子モデリングによるカンナ  
ビノイドとヒト CYP 分子種の相互作用解析、  
分子モデリングによるカンナビノイドとヒ  
ト CYP 分子種の相互作用解析、モレキュ  
ラー・キラリティー2008、岡山市、岡山大学  
創立 50 周年記念館 (2008.5.22) .

図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 和人 (WATANABE KAZUHITO)  
北陸大学・薬学部・教授  
研究者番号：30113038

(2)研究分担者

山折 大 (YAMAORI SATOSHI)  
北陸大学・薬学部・助教

研究者番号：40360218

(3)連携研究者

竹田 修三 (TATEDA SHUSO)  
第一薬科大学・講師  
研究者番号：00460379